

Poly I:C compound immunologic adjuvant and vaccine containing the adjuvant

Publication number: CN1095951
Publication date: 1994-12-07
Inventor: HAIXIANG LIN (CN)
Applicant: LIN HAIXIANG (CN)
Classification:
- **International:** A61K39/39; A61K39/39; (IPC1-7): A61K39/39
- **European:**
Application number: CN19931005862 19930531
Priority number(s): CN19931005862 19930531

[Report a data error here](#)

Abstract of CN1095951

The present invention relates to immunologic adjuvant or reinforcer, i.e., poly I:C containing kanamycin and calcium ions (PICKCa), and esp. the application of vaccine containing PICKCa in viral infection period of human or mammal.

.....
Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 93105862.7

[51]Int.Cl⁵

[43]公开日 1994年12月7日

A61K 39/39

[22]申请日 93.5.31

[71]申请人 林海祥

地址 100071北京市丰台方庄芳星园三区31楼
1-203号

[72]发明人 林海祥

[74]专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
代理人 程伟

说明书页数: 附图页数:

[54]发明名称 聚肌胞复合物免疫佐剂及含有该佐剂的
疫苗

[57]摘要

本发明涉及一种含卡那霉素和钙离子的聚肌胞(PICKCa)做为免疫佐剂或增强剂的应用特别是涉及含 PICKCa 的疫苗及将 PICKCa 应用于哺乳动物或人的病毒感染期。

权 利 要 求 书

1. 含卡那霉素和钙离子的聚肌胞 (PICKCa)
) 做为免疫佐剂的应用。

2. 含卡那霉素和钙离子的聚肌胞 (PICKCa)
) 佐剂疫苗。

3. 含卡那霉素和钙离子的聚肌胞 (PICKCa)
) 做为免疫增强剂的应用。

4. 如权利要求 2 和 3 所述的应用，其特征在于所述的应用是指含卡那霉素的钙离子的聚肌胞 (PICKCa) 在哺乳动物或人在病毒感染期的应用。

5. 如权利要求 2 所述的疫苗，其特征在于所述疫苗在哺乳动物或人在病毒感染期的应用。

说 明 书

聚肌胞复合物免疫佐剂及含有该佐剂的疫苗

本发明涉及一种新免疫佐剂及含有该佐剂的疫苗，特别是涉及一种聚肌胞复合物免疫佐剂及其应用。

免疫佐剂是一种能提高抗原免疫反应的因子。由于这种因子的作用是加强几乎所有T细胞依赖性抗原的免疫反应，所以免疫佐剂的作用是非特异性的。免疫佐剂又称免疫增强剂，除了能提高抗原的免疫效果外，也用于非特异性地提高机体抗细菌、真菌、病毒、寄生虫感染和肿瘤的能力。

众所周知，疫苗是人类防治病毒病最有力的武器。在现有技术中，由于各种遗传工程疫苗，合成多肽，亚单位疫苗以及一些小颗粒的全病毒灭活疫苗的免疫效果不好，通常都须用佐剂。目前国际上批准的人用佐剂只有铝佐剂。铝佐剂的缺点是不能刺激机体产生细胞免疫，也不能促进某些抗原的体液免疫以及其它一些弊病，因而远远满足不了实际需要 (Anthony D. C hinnah, et. al Vaccine, V ol. 10 Issue 8, 1992. 551)

为了克服现有技术的不足，本发明的目的在于提供一种新型的佐剂以及含有该佐剂的疫苗。这种新型佐剂安全稳定，能诱生干扰素，白细胞介素Ⅱ，并抑制病毒繁殖，提高疫苗的效价，显著提高机体 IgM, IgG 和中和抗体的产生。

本发明涉及含卡那霉素和钙离子的聚肌胞 (Polyribenosinic-polyribocytididyllic acid (PIC) containing Kamamycin and calcium) 做为免疫佐剂的应用。本文中以下将所述的含卡那霉素和钙离子的聚肌胞简称为 **PICKCa**。

早在 70 年代国际上就已发现了 **PIC**，双链聚肌胞具有很好的诱生干扰素作用，在此之后又发现了其衍生物，即含多聚赖氨酸和羧甲基纤维素的聚肌胞 (**PIC containing polyL-Lysine and Carboxymethylcellulose, PICLC**)。但是 **PIC** 不能用于灵长类从上的动物包括人体而 **PICLC** 的毒性太大也不能用于人体。于是人们继续研究终于发现了 **PICKCa**，这种药品只是用于对某些病毒病的治疗。本领域技术人员熟知感染和发病是完全不同两个概念。**PICKCa** 的发现是用于病毒感染后，并且确诊患上病毒病时才使用。而且就 **PICKCa** 对病毒病的治疗效果也不尽人意。特别应当指出的是至今为止没有任何资料报道将该已知的药品做为免疫佐剂来加以使用。

PICKCa 的用量是公知，因此通常每支疫苗中，可加入 1 ~ 2mg **PICKCa**，其它按不同疫苗的要求进行免疫注射。因此，本发明对 **PICKCa** 的用量不加以进一步的说明。

本发明涉及的佐剂 **PICKCa** 具有如下有益的效

果：

1. **PICKCa**同病毒抗原或灭活疫苗结合后能显著地提高该抗原或疫苗的免疫效果，即具有显著的免疫佐剂的作用。

2. 由于**PICKCa**本身在人体上已经使用，使得**PICKCa**很容易地被人们接受，并替带目前使用的铝佐剂而独树一帜，成为很有前途的新的佐剂。

3. 单独**PICKCa**用于病毒性疾病感染的潜伏期具有显著的抗病毒效果。

4. **PICKCa**与病毒抗原或灭活疫苗结合后，用于病毒感染潜伏期的治疗较单纯应用**PICKCa**又进一步增加了治疗效果。

由于免疫佐剂的非特异性，**PICKCa**将在病毒、细菌、寄生虫感染治和抗肿瘤中产生重要作用；特别是将对多种疫苗产生显著的免疫佐剂作用。本文所涉及的疫苗包括人用狂犬病疫苗，流行性出血热疫苗，但并不限制于此。

图表说明：

表1：**PICKCa**诱生干扰素的测定。

表2：**PICKCa**诱生白胞介素Ⅱ的测定。

表3：用**PICKCa**来诱生小鼠体内IgG和中和抗体的测定。

表4：**PICKCa**降低感染狂犬病病毒小白鼠的死亡率。

表5：**PICKCa**与狂犬病毒抗原结合后，免疫

OF 1 小鼠，在不同时间分离血清检测其 IgM、IgG 和中和抗体的结果。

表 6，表 7：PICKCa 促进疫苗效价的结果。

表 8：说明 PICKCa 与狂犬病素抗原结合后，进一步降低感染狂犬病毒小白鼠的死亡率结果。 表 9：对于 PICKCa 和疫苗结合后安全性的检测。

表 10：所示 PICKCa 促进流行性出血热灭活疫苗抗体的产生情况。

为了进一步理解本发明，以下将结合实施例详细说明本发明的实质。下述的实施例并非意在限定本发明，只是帮助人们理解本发明。

实验例 1

PICKCa 诱生干扰素。取 OF 1 小鼠 20 只肌注 PICKCa，每只 0.05~0.1 mg。在不同时间分离小鼠血清，通过抑制 VSV 病毒在 L929 细胞产生的病变，然后通过显色法测定血清干扰素的产生情况。测定方法见 Mossman T., Rapid Colormetric assay for cellular growth and Survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immun. Met

h 1983, 65: 55-63.

该试验的结果见表1。

该试验结果表明**PICKCa**能诱生高滴度干扰素，并在注射2小时即可达到高峰。

实验例2

本实验为**PICKCa**诱生白细胞介素Ⅱ (IL-2) 及其测定。取C_aH小鼠，用抗原，即灭活提纯狂犬病毒 (IPRV) 和**PICKCa**免疫小鼠。每只腹腔注射0.1ml。取小鼠脾脏，用³H标记CTLL细胞法测定IL-2。该方法见 Joffret M L, et al. Appraisal of Rabies Vaccine Potency by Determination of In vitro, Specific Interleukin-2 Production. Biologicals, 1991, 19 (2): 113-123.

该试验的结果见表2。表明**PICKCa**能够非特异性地提高IL-2产量。

实验例3

A/J小鼠用活的狂犬病毒野毒株RD 9147感染后，用**PICKCa**治疗，用ELISA法 (Perrin P. T Techniques for the preparation of re

abies conjugates in Laboratory techniques in rabies (4th, edition) WHO或RF FIT方法 (Smith J. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. Bull. Wild hith Org. 1973. 48: 535-5

41) 测定小鼠体内狂犬病毒 IgG 和中和抗体的滴度。每只小鼠体内狂犬病毒株 0.1 ml, 然后在 5 小时, 3 天和 7 天各肌注 **PICKCa** 0.05 ml / 只, 并于不同时间抽血检测 IgG 和中和抗体的滴度, 其结果见表 3。

结果表明: 小鼠在受到 **RD9147** 感染后, 用 **PICKCa** 治疗其 IgG 和中和抗体的滴度大大降低。表明由于 **PICKCa** 显著抑制了病毒的繁殖, 而使之不能刺激机体产生抗体。

实验例 4

PICKCa 降低感染狂犬病小白鼠的死亡率。

将 40 只 **OF1** 小鼠随机分成 4 组, 每组 10 只, 用狂犬病野毒株 **RD4077** 感染小鼠, 每只 0.1 ml 感染后的 6 小时, 第 3, 7, 14 和 18 天用 **PICKCa** 治疗, 每只 0.05 ml, 肌注, 观察小鼠的死亡

率，其结果见表4。

该结果说明**PICKCa**在狂犬病毒感染的潜伏期，能够极其显著地降低小白鼠的死亡率。

实验例5

PICKCa同狂犬病毒疫苗结合后的安全性测定。选用2组狂犬病毒疫苗分别加入**PICKCa**，分别对小鼠进行脑内和腹腔注射，观察其死亡情况。

结果（见表9）表明安全。本试验按“中国药典”急性毒性试验测量方法进行。

实施例1

OF1小鼠46只随机分成4组。本试验是**PICKCa**与狂犬病毒抗原结合后，即制成疫苗，免疫OF1小鼠，以该抗原组和抗原加铝佐剂组以及空白为对照，在不同的时间分离小鼠血清检测IgM，IgG和中和抗体。其结果是表5。

本试验中IgG和中和抗体的测定方法同实验例3中所用的方法相同，IgM测定法是ELISA法测定。

该结果显示抗原+**PICKCa**组能刺激体提前和提高产生IgM，IgG，特别是中和抗体，而铝佐剂却使抗体产生滞后，说明以**PICKCa**为佐剂，其效

果大大地高于Al₂O₃的佐剂效果。

实施例 2. 3

PICKCa促进疫苗的效价。

如表6所示，用NIH法WHO Laboratory techniques in rabies (3th edition) 1973检测，**PICKCa**可降低使用半数有效抗原量(ED₅₀) 5-10倍，而铝佐剂仅降低1-2倍。

如表7表示，用NIH法测定**PICKCa**对人用狂犬病疫苗的佐剂效果。表明**PICKCa**可显著提高人用狂犬疫苗的效力(国际单位)，使之均可从不合格而达到国际标准以上(2.5国际单位)。

实施例 4

PICKCa与狂犬病毒抗原结合后，肌注小白鼠又进一步降低感染狂犬毒小白鼠的死亡率。

本试验的目的是当小鼠用野毒株感染后观察**PICKCa**或Al₂O₃同灭活提纯狂犬病毒结合后，对小鼠的保护作用。

如表8所示**PICKCa**与狂犬病疫苗结合后治疗感染了狂犬病野毒株的小白鼠，较单纯用**PICKCa**治疗，又进一步降低了小白鼠的死亡率，单纯灭活疫苗

治疗效果微乎其微，而加入铝佐剂则完全不起作用。

实施例 5

PICKCa促进流行性出血热灭活疫苗抗体的产生本试验采用**Al(OH)**做对照。**PICKCa**与出血热灭活疫苗等量混合后，肌注实验家兔，1ml/只，隔周一次，在第14和21天抽血，用**ELISA**和**RPHI**检测抗体产生情况。

其结果见表10。表明**PICKCa**促进流行性出血热疫苗**ELISA**抗体效价4-8倍，**RPHI**抗体2倍，而铝佐剂仅分别为0~4倍，对**RPHI**抗体反而降低。

表 1 PICACa 诱生小鼠干扰素的测定

时间 (小时) 注射后干扰素滴度 (国际单位 $\times 10^{-8}$)

PICKCa

0	< 5
1	< 5
2	320
3	24
4	5
6	< 5

表 2 用PICKCa和灭活提纯狂犬病毒(IPRV) 免疫小鼠
诱生白细胞介素-2的测定

免疫 PICKCa注射 (μ g)	体外刺激 IL-2的测定			PICKCa
	培养液	IPRV	($\text{cpm} \times 10^{-8}$)	
PBS*	0	1. 1	1. 1	0. 9
PBS	75	0. 5	0. 6	0. 9
IPRV	0	0. 6	13. 9	2. 7
IPRV	75	3. 7	15. 7	2. 0
		(0) **	(12. 0) **	

* PBS: 磷酸盐酸缓冲液

**: 与培养液 IL-2的差值

表 3: 用ELISA或RFFIT法测定RD9147狂犬病
野毒株感染后, 并且PICKCa处理后A/J小鼠体内
狂犬病 IgG和中和抗体的滴度

不同日期 感染鼠的血清	感染后PICKCa 治疗时间	ELISA测 IgG的滴度 (MIU/ml)	RFFIT测中和 抗体的滴度 (IU/ml)
RD9147 3天	/	/	0. 28
RD9147 3天	第7小时	/	<0. 28
RD9147 8天	/	2528	1. 60
RD9147 8天	第5小时, 第3天和 7天	<224	<0. 25
RD9147 15天	/	11520	3. 38
RD9147 15天	第3小时, 第 3, 7, 10 14天	3120	<0. 28
PBS	15天	68	<0. 28

表明PICKCa显著抑制了狂犬病毒在小鼠体内的繁殖。

表 4 PICKCa降低用RD4077狂犬病野毒株感染的OF1小鼠死亡率

组	RD4077 稀释度	死亡率	潜伏期(天)
PICKCa	纯	4/10	17, 18, 20, 22
	10^{-1}	0/10	
对照组	纯	10/10	10, 11, 12, 13, 14, 13, 13, 17, 17, 17
	10^{-1}	10/10	11 13, 14, 14, 17, 17, 17, 19,

表5 用狂犬病毒抗原(V427)或同该抗原结合的PICKCa或者Al₂O₃免疫OF1小鼠, 测定其狂犬病IgM, IgG和中和抗体的滴度

免疫血清	IgM滴度	IgG滴度	中和抗体滴度
	ELISA法 AU/ml	ELISA法 MIU/ml	RFFIT法 IU/ml
第4天			
Ag	180	87	0. 25
Ag+PICKCa	413	264	1. 01
Ag+Al ₂ O ₃	231	97	<0. 13
第7天			
Ag	615	1522	1. 01
Ag+PICKCa	>1600	4166	6. 65
Ag+Al ₂ O ₃	169	351	0. 43
第14天			
Ag	479	4900	2. 54
Ag+PICKa	522	26320	17. 24
Ag+Al ₂ O ₃	408	12000	11. 97

第30天

Ag	107	1800	3. 01
Ag+PICKCa	150	18600	15. 63
Ag+Al ₂ O ₃	190	4000	6. 86

第60天

Ag	117	5000	2. 10
Ag+PICKCa	150	18800	15. 96
Ag+Al ₂ O ₃	98	6000	7. 64

空白对照	16	40	-
------	----	----	---

表 6 用 NIH 试验测定注射 PICCKa 或 Al_2O_3 后的小鼠对灭活狂犬病毒的保护作用

佐剂	注射剂量 (μg)	注射日期	半数有效量
无	0	7	
PICCKa	100	100	221
	800	800	22
Al_2O_3	3000	3000	40
	1000	1000	93
			132

表 7 用 NIH 试验测定 PICCKa 对人用狂犬病疫苗的
激刺效价

编号	试验组	ED50	效价	CVS	LD50
疫苗 81163					
	+PICCKa				
	4℃下4周	2. 18	4. 33 IU/2ml		5
1	37℃下4周	1. 96	2. 64 IU/2ml		5
疫苗 89163					
	4℃下4周	1. 80	1. 82 IU/2ml		5
	37℃下4周	1. 71	1. 48 IU/2ml		5
	参照品 84-5	2. 53	4. 9 IU/安瓶		5
疫苗 890842					
	+PICCKa				
	4℃下4周	1. 99	4. 58 IU/2ml		5
2	37℃下4周	1. 74	2. 60 IU/2ml		5
疫苗 890842					
	4℃下4周	1. 53	1. 58 IU/2ml		5

参照品 84-5 2. 32 4. 9 IU/安瓶 5

参照品 84-5

+PICKCa 2. 49 14. 1 IU/安瓶 32

参照品 84-5 2. 03 4. 9 IU/安瓶 32

表 8 PICKCa, Al_2O_3 及其与狂犬病毒抗原结合后, 对感染狂犬病毒小鼠的治疗效果

用 IPRV 治疗后 (注射量 μ g) 的死亡率			
其它治疗	0	140	560
无	95 (19/20) *	95 (19/20)	20 (7/10)
PICKCa	30 (3/10)	95 (19/20)	70 (7/10)
Al_2O_3	100 (10/10)	95 (19/20)	70 (7/10)

* 小鼠死亡数 / 感染狂犬病毒小鼠数

表 9 狂犬病疫苗与PICKCa结合后对18克体重的小白鼠安全性测定

实验组数	组别	0.03 ml i. c	0.5 ml i. p
1	疫苗89163 +PICKCa	存活率2/2	存活率5/5
2	疫苗89163 +PICKCa	存活率2/2	存活率5/5

表 10 PICKCa或铝佐剂在家兔体内对流行性出血热疫苗抗体测定

兔号	免疫组别	14天血清		21天血清	
		ELISA	RPHI	ELISA	RPHI
1	疫苗+A1(OH) ₃ +PICKCa	2048	/	2048	/
2	疫苗+A1(OH) ₃ +PICKCa	2048	/	1024	/
3	疫苗+PICKCa	4096	32	4096	32
4	疫苗+PICKCa	4096	32	4096	32
5	疫苗A1(OH) ₃	1024	/	512	8
6	疫苗A1(OH) ₃	2048	/	1024	8
7	疫苗	512	16	512	16
8	疫苗	512	16	512	16

ELISA: 酶联免疫吸附测定

RPHI : 反应被动血凝抑制试验